

用于计算机分析的食管细胞涂片的制备

——食管癌细胞自动分类的研究专题之一

舒仪经 周彬

(中国医学科学院肿瘤研究所)

应用电子计算机自动识别细胞的第一步是数据获取,即将制备好的细胞样品,通过带有计算机控制的扫描显微分光光度计产生一组反映细胞各部位透光度或吸光度的灰度数字图象。为了获得反映细胞真实情况的数据,用于由计算机控制扫描的细胞涂片必须满足下列要求:

1. 扫描是对一个个细胞分别进行的,因此涂片内的细胞必须各个散开,防止重叠。每平方毫米内重叠的细胞团数最好不超过三个。

2. 涂片内的细胞间距,不宜过小(见80页图1a),否则易使细胞数字图象彼此相连,计算机处理时就会误把相连的若干细胞当作一个细胞,造成很大误差。目前我们采用的最大扫描步距为4微米。考虑到扫描起始点的随机性,要求细胞间距至少为8—10微米,每平方毫米内的细胞数约50个。

3. 要求涂片背景中的炎症细胞少,粘液少,更不能混有食物残片。被测细胞周围的背景要清晰明朗,细胞边界要清楚。

4. 细胞着色应核浆分明,染色质结构清楚。要求染色尽可能标准化,以达到细胞样品所获取的数据的统一性。

上述要求用常规的食管拉网涂片不能满足,必须研究新的涂片制备方法。

一、方法与结果

最初采用生理盐水与食管拉网摄取物混合稀释后直接涂片,虽尽量涂得薄一些(见80页图1b),但效果仍不满意。后经多次改进,又参考了田中氏^[1]采用的细胞过滤方法,目前所制作的涂片已基本符合要求(见80页图1c)。制

备过程说明如下:

(1) 用食管拉网采集细胞样本(或食管手术切除标本的刮取物作细胞样本)。

(2) 将拉网置入盛有林格氏溶液的缸中洗刷。

(3) 将(2)的溶液倒入离心管中,2000转/分离心5分钟。

(4) 用吸管轻轻吸掉多余的林格氏溶液,使剩下的林格氏液为沉淀细胞样本的2—3倍。

(5) 用吸管进行搅拌震荡,使成团的细胞散开,直至无絮状颗粒为止。

(6) 将震荡后的混合溶液倒入过滤器过滤。过滤器采用筛孔边长为1500微米的铜网筛盘,过滤时注意不要让粘液堵塞筛孔。如果只要底层或中层细胞,则筛孔需再小些。

(7) 用7号针头的注射器吸取已过滤的细胞溶液。

(8) 在干净的玻片上按照做血片的方法涂片。待潮干后立即放入95%的酒精中固定。最后用巴氏染色法染色。

二、讨 论

1. 防止细胞重叠,文献报道一般采用蛋白分解酶(d-糜蛋白酶,胰酶)或活性剂(EDTA, Fluronic 68)^[2]等进行处理,但易使细胞溶解,影响细胞形态。我们采用的是机械震荡法,既能使细胞分离,而又不影响形态。

2. 一般认为每平方毫米内约有50个细胞较好^[3]。我们曾将过滤法和非过滤法的涂片作对比。非过滤法每平方毫米内约有80个细胞,成群的细胞团数在5个以上,重叠较多。而过

滤法(筛孔大小为 1500 微米/孔)每平方毫米内约有 35 个细胞,成群细胞团数在 3 个以下,重叠少,背景清晰,涂片基本符合计算机分析细胞的要求。若应用计算机进行细胞筛选,则嫌这种涂片方法的细胞量太少,影响检出率。可采用调整剩下的林格氏溶液量的方法来改变细胞浓度。

3. 制片过程是否标准化,例如稀释液倍数,离心速度,染色过程等是否一致,是获取细胞数据是否标准与准确的一个重要因素。

细胞涂片的制备质量直接影响后续环节(如信息输入与数据获取,细胞数字图象的区域划分与提取,细胞特征的抽提与选择,细胞的诊断与分类等),因此必须认真按严格要求作好。

参 考 文 献

[1] Tanaka, N. et al.: Field Test and Experimental Use of CYBEST Model 2 for Practical Gynecologic Mass Screening, In printing, 1979.
 [2] 菊地等: 日临会志, 16 (2), 205, 1977.
 [3] Tanaka, N. et al.: Acta. Cytol., 21, 531, 1977.

细胞图象的预处理方法

——食管癌细胞自动分类研究专题之二

王 今 著

(中国科学院生物物理研究所)

如前文所述由于涂片制备和染色工艺方面的问题,在视野范围内除观察到待识的主要图象外,往往在背景上还夹杂着一些次要图象。当应用电子计算机对前者进行研究时,必须经过预处理的步骤将后者去掉,以便提出待识的主要图象,使计算机能够进行细胞图形的区域划分、特征抽提,和分类判决。

预处理的方法很多,本文只给出我们初步

认为对细胞数字图象来说是行之有效的一种。

一、细胞图象预处理的步骤和方法

1. 平滑和边缘增强技术 目前所用方法大都是将输入的二维数字图象与模板窗口(例如 3×3 或 5×5 的窗口)进行离散卷积运算,结果就是处理后的某个象素。模板窗口的系数选得不同,得到的处理效果也不同,如下图所示:

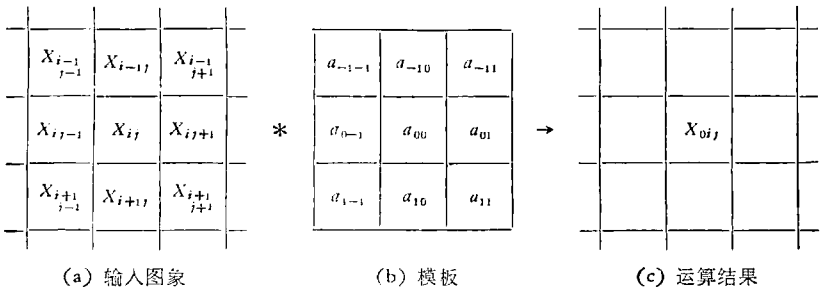


图 1 二维数字图象与模板的卷积运算示意图

运算方式如下:

$$X_{0i,j} = \sum_{k=-1}^1 \sum_{l=-1}^1 a_{kl} \cdot X_{i+k,j+l} \quad (1)$$

当模板中系数 a 均取正值时,效果相当于

低通滤波器,处理结果使图象“平滑”以消除高频噪声;如果系数 a 有一部分取负值时,其效果相当于高通滤波器,处理结果使图象的边缘反差增加。

在平滑处理中采用的模板系数如下:

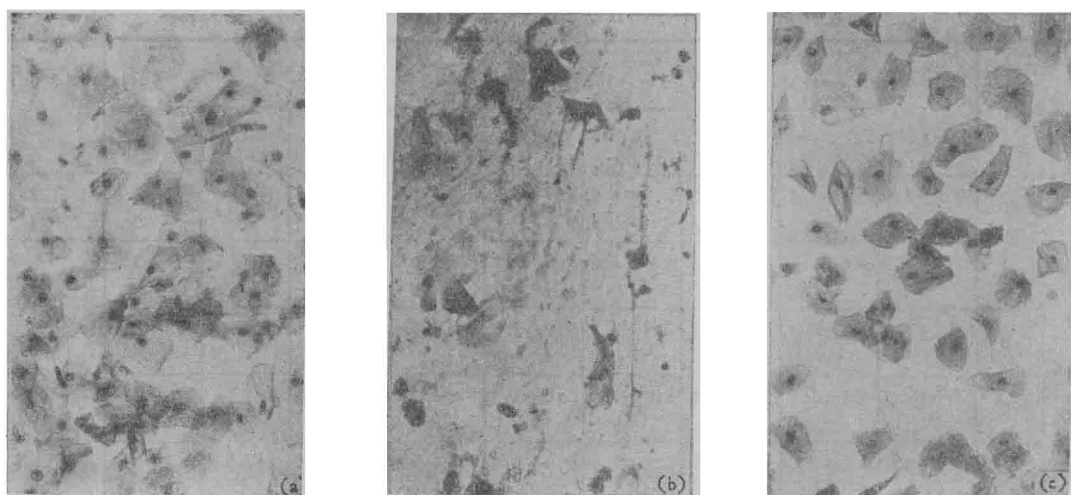


图1 食管上皮细胞涂片(a、b、c)

简 讯

中国科学院制订生化试剂研制、生产规划

为解决科研急需,今年3月我院召开了专门会议,制订了1980年—1985年生化试剂研制、生产规划。

生化试剂是现代生物学研究中的重要条件。国际上对生化试剂研制十分重视,生化试剂发展很快,作为商品出售的有六千种。据初步估计我国每年需要二千五百种,而我们掌握生产工艺的约七百种,因限于人力、设备只能生产三百种,远远满足不了需要。因此不得不大量进口,不仅耗费大量外汇,而且因订货周期长,到货不及时,到货后活力也降低,严重影响科研工作开展。为改变此种状况,会议决定今后六年,我院组织力量,采取有力措施,在人力、物力方面给予支持,将生化试剂发展到一千多种,其中能批量生产供应约五、六百种。开展分子遗传学和遗传工程研究不可缺少的工具酶,由已研制、生产的20种,计划到83年再研制16种。在生化试剂研制安排上,重点保证院内,特别是

重点研究项目和难以进口的,同时兼顾院外单位需要。

为了搞好分工协作,又各有侧重,我院生化试剂研制、生产的四个主要单位大体分工如下:

上海生化所东风生化试剂厂:蛋白质多肽、氨基酸、核酸、核苷酸及其衍生物、酶、遗传工程工具酶、保护基、糖、脂类、部分同位素标记化合物。

生物物理所生化试剂厂:酶类为主,遗传工程工具酶、培养基、分离工具,及部分同位素标记化合物等。

上海药物所中间试验工厂及抗菌素车间:以分离工具为主,抗生素、生物碱、生理药理试剂及一些遗传工程工具酶等。

微生物所发酵车间:以发酵产品为主,氨基酸、有机酸类酶制剂等,以及一些遗传工程工具酶。

昆明动物所、上海原子核所等单位也要研制、生产有自己特色的生化试剂。